

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-199883

(43)公開日 平成5年(1993)8月10日

(51)Int.Cl*	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 12 N 15/54	ZNA	9050-4B		
1/19		7236-4B		
1/21		7823-4B		
9/10		8931-4B	C 12 N 15/ 00	A

審査請求 未請求 請求項の数17(全23頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平3-267860

(22)出願日 平成3年(1991)10月16日

(31)優先権主張番号 特願平2-282566

(32)優先日 平2(1990)10月19日

(33)優先権主張国 日本 (JP)

(71)出願人 000216162

天野製薬株式会社
愛知県名古屋市中区錦1丁目2番7号

(71)出願人 000000068

味の素株式会社
東京都中央区京橋1丁目15番1号

(72)発明者 高木 博史

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1番1号 味
の素株式会社中央研究所内

(72)発明者 荒堀 志乃

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1番1号 味
の素株式会社中央研究所内

(74)代理人 弁理士 川口 義雄 (外3名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 リコンピナントトランスグルタミナーゼ

(57)【要約】

【構成】 トランスグルタミナーゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むDNAを提供する。さらに、上記DNAを組込んだ発現分泌ベクター、該発現分泌ベクターにより形質転換された形質転換体、及び該形質転換体を培養することを特徴とするトランスグルタミナーゼ活性を有するタンパク質の製造方法を提供する。

【効果】 遺伝子工学的手法により、トランスグルタミナーゼの効率的な大量生産が可能になる。

CCCCGTGAGG TCGCGTCCGT GATCAACAGG CCCTCGAGA ACCCCACCA CGAGACCCCT
TACCTCGACA ACCTCAAGAA CGAACCTCGG AAAGGCAACG ACCCCCTCGG CAACGAGAC
CCCCGTTGCC CGTCTACTC CGCGCTCGG AACACCCGT CCTTTAAGGA CGCGAACGGA

GGCAATCACG ACCCGTCCAG GATGAAGGCC GTCATCTACT CGAACCACTT CTGGACCCCG
CAGGACCCGT CGAGTCCGGC CGACAAGAGG AAGTACCGG ACCCGACCC TTTCCGCCCC
CCCCCGGGA CGCGCTCGT CGACATGTCG AGCGACAGGA ACATTCGGG CAGCCCCAC
AGCCCCCGTC AGCGATTCGT CAATTCGAC TACCGCTGGT TCGGGGCCA GACCGAACCG
GACCCCGACA AGACCGTCTG GACCCACGGG AATCACTATC ACGCCCAA TGCCAGCCCT
GGTCCCATCC ATGTATACGA GAGCAAGTT CGCAACTGGT CGGAAGGTA CTCCGACTTC
GACCCGGGAG CCTATGTATC CACCTTCATC CGAACAGCT CGAACACCCC CCCCCACAAG
GTAAGGAGG GCTGGCCG

【請求項6】 化学合成により得られることを特徴とする、請求項1～4のいずれか一項記載のDNA。

【請求項7】 クローニングにより得られることを特徴とする、請求項1、3又は5記載のDNA。

【請求項8】 請求項1～7のいずれか一項記載のDNAを組込んだ発現分泌ベクター。

【請求項9】 pOMPA-BTG である請求項8記載の発現分泌ベクター。

【請求項10】 pNJ1053-proBTG である請求項8記載の発現分泌ベクター。

【請求項11】 pNJ1053-BTG である請求項8記載の発現分泌ベクター。

【請求項12】 pIJ702-BTG である請求項8記載の発現分泌ベクター。

【請求項13】 請求項8～12のいずれか一項記載の発現分泌ベクターにより形質転換された形質転換体。

【請求項14】 大腸菌であることを特徴とする請求項13記載の形質転換体。

【請求項15】 酵母であることを特徴とする請求項13記載の形質転換体。

【請求項16】 放線菌であることを特徴とする請求項13記載の形質転換体。

【請求項17】 請求項13～16のいずれか一項記載の形質転換体を培養することを特徴とする、トランスクルタミナーゼ活性を有するタンパク質の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、トランスクルタミナーゼをコードするDNA遺伝子、該遺伝子を組込んだプラスミド、該プラスミドが導入された形質転換体及び該形質転換体を培養することを特徴とする、トランスクルタミナーゼの製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 トランスクルタミナーゼ（以下、「BTG」と略する。）は、ペプチド鎖内にあるグルタミン残基の α -カルボキシアミド基のアシル転移反応を触媒する酵素である。

【0003】 このトランスクルタミナーゼは、アシル受容体としてタンパク質中のリシン残基の ϵ -アミノ基が作用すると、分子内及び分子間に ϵ -（ γ -Gln）-Lys架橋結合が形成される。また水がアシル受容体として機能するときは、グルタミン残基が脱アミド化されグルタミ酸残基になる反応を進行させる酵素である。

【0004】 トランスクルタミナーゼは、ゲル状食品、ゲル化状料をはじめとしてヨーグルト、ゼリー及びチーズなどを製造する際に用いられている（特公平1-50382号）。

【0005】 更に、熱に安定な、マイクロカプセルの素材、固定化酵素等の担体などを製造する際にも利用されている。

【0006】 トランスクルタミナーゼはこれまで動物由来のものが知られている。例えばモルモットの肝臓 [Connellan, et al., Journal of Biological Chemistry 246巻4号, 1093～1098頁(1971)] 及び哺乳動物の臓器、血液に広く分布し [Folk et al., Advances in Enzymology 38巻, 109～191頁(1973) ; Folk et al., Advances in Protein Chemistry 31巻, 1～133頁(1977)]、その酵素の特徴も研究されている。

【0007】 更に、ストレプトペルチシリウム属の菌から、上記動物由来のトランスクルタミナーゼとは異なり、カルシウム（Ca²⁺）非依存性のトランスクルタミナーゼが発見されている。同属菌の具体例としては、ストレプトペルチシリウム・グリセオカルネウム (Streptoverticillium griseocarneum) IFO 12776, ストレプトペルチシリウム・シナモネウム・サブ・エスピー・シナモネウム (Streptoverticillium cinnamoneum sub sp. cinnamoneum) IFO 12852, ストレプトペルチシリウム・モバラエンス (Streptoverticillium moharaense) IFO 13819 等があげられている（特開昭64-27471号参照）。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】 従来、トランスクルタミナーゼは動物、菌類等から製造されているため、供給量、供給費用等の点で改善すべき点が多くあった。

【0009】 本発明者等は、上記課題を解決すべく鋭意

研究の結果、トランスグルタミナーゼをコードするDNAを精製・単離し、その塩基配列を決定することに成功した。かかる成果に基づいて、遺伝子工学的手法により、大腸菌等の微生物を用いて該DNAを発現させ、トランスグルタミナーゼの効率的な大量生産への途を開いたものである。

【0010】

【課題を解決するための手段】従って、本発明は、トランスグルタミナーゼをコードするDNAを提供するものである。

【0011】即ち、アミノ酸の一文字記号で表したとき、下記の第1表のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むDNAを提供するものである。

【0012】

【表6】

第 1 表

10	20	30	40
DDDDTTTAA	TTTCCCCCTT	TTTGTGTTT	TTT
50	60	70	80
TTTGGGGCGG	GGGGGGGGGG	GGGGGGGGGG	GGGGGGGGGG
90	100	110	120
ATTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT
130	140	150	160
TCGTCATGAA	TCGTCATGAA	TCGTCATGAA	TCGTCATGAA
170	180	190	200
TTTGTGTTT	TTTGTGTTT	TTTGTGTTT	TTTGTGTTT
210	220	230	240
TTTGGGGCGG	TTTGGGGCGG	TTTGGGGCGG	TTTGGGGCGG
250	260	270	280
TTTTTTTTTG	TTTTTTTTTG	TTTTTTTTTG	TTTTTTTTTG
290	300	310	320
TCGTCATGAA	TCGTCATGAA	TCGTCATGAA	TCGTCATGAA
330			
TATTTTGTGTT			

かかるDNAは、遺伝コドンの縮重を考慮すると、種々の塩基配列を包含し得るものである。

【0013】これらの塩基配列は、遺伝子発現系の諸要素、例えば宿主細胞の種類等に応じた優先コドン等によって当業者が容易に選択し得るものである。

【0014】その一具体例として、大腸菌又は酵母を宿主細胞として用いる発現系に適した塩基配列の一例を第2表に示す(配列番号1)。

【0015】

【表7】第2表

GAT TCT GAT GAC AGA GTC ACT CCA CCA GCT
GAA CCA TTG GAT AGA ATG CCA GAT CCA TAC
AGA CCA TCT TAC CGT AGA CCT GAA ACT GTT
GTC AAC AAC TAC ATT AGA AAG TGG CAA CAA
GTC TAC TCT CAC AGA CAT CGT AGA AAG CAA
CAA ATG ACT GAA GAA CAA AGA GAA TGG TTG

6

TCT TAC GGT TGT GTT CGT GTT ACT TGG GTT
AAC TCT CGT CAA TAC CCA ACT AAC AGA TTG
GCT TTC CGT TCT TTC GAT GAA GAT AGA TTC
AAG AAC GAA TTG AAG AAC CGT AGA CCA AGA
TCC CGT GAA ACT AGA CCT GAA TTC GAA GGT
AGA GTT CGT AAG GAA TCT TTC GAT GAA GAA
AAG CGT TTC CAA AGA CCT AGA GAA GTT CGT
TCT GTT ATG AAC AGA CCT CTA GAA AAC CCT
CAC GAT GAA TCT CGT TAC TTG GAT AAC TTG
10 AAG AAG GAA TTG CGC AAC CGT AAC GAT GCT
TTG AGA AAC GAA GAT GCT AGA TCC CCA TTC
TAC TCT CGT TTG AGA AAC ACT CCA TCT TTC
AAG GAA AGA AAC CGT CGT AAC CAC GAT CCA
TCC AGA ATG AAG CCT GTT ATT TAC TCT AAC
CAC TTC TCG TCT CGT CAA GAT AGA TCT TCT
TCT CGT GAT AAG AGA AAG TAC CGT GAT CCA
GAT CGT TTC AGA CCA CCT CCA CGT ACC CGT
TTG GTC GAC ATG TCC AGA GAT AGA AAC ATT
CCA AGA TCC CCA ACT TCT CCA CGT GAA GGT
20 TTC GTC AAC TTC GAT TAC CGT TGG TTC CGT
CCT CAA ACT GAA GCT GAT CGT GAT AAG ACT
GTT TGG ACC CAT CGT AAC CAC TAC CAC CGT
CCA AAC CGT TCT TTG CGT CGT ATG CAC GTC
TAC GAA TCT AAG TTC AGA AAC TGG TCT GAA
CGT TAC TCT GAT TTC GAT AGA CGT CGT TAC
GTT ATT ACT TTC ATT CCA AAG TCT TGG AAC
ACT CCT CCA GAC AAG GTC AAG CAA CGT TGG
CCA

第1表に示したDNAは從来公知の化学的合成法等により調製することができる。

【0016】本発明は更に、第1表に示したアミノ酸配列をコードするDNAの5'末端に、以下の第3表に示す、シグナルペプチドを含むアミノ酸配列の全部又は一部をコードする塩基配列を含むDNAをも提供するものである。

【0017】

【表8】

第 3 表
-75 -70 -60 -50 TTTTT TATTTT TAA TTTTTT TAA TTTTTT TAA TTTTTT
-40 -30 -20 -10 CTTTT TTTTTT TTTTTT TTTTTT TTTTTT TTTTTT TTTTTT

上記DNAも遺伝子コドンの縮重により種々の塩基配列を包含し得るものである。一具体例としては、第2表に示した塩基配列の5'末端に以下に示す塩基配列(配列番号2)を有するものが挙げられる。

【0018】

【表9】

AACAGAAGATCTCAAACCTCCAAACCCAACTCTTCTAGAAGAATGACTCTAGACACCAA
AGACCTCAAAGATCTCTCCAGCTGCTTCTCTGCTGCTTCTAGACACCAA

また、その取得方法も化学的合成法も含めて種々のもの
が考えられる。例えば、PCR (Polymerase Chain Rea-
ction) 法により得られたDNA断片をプローブとして
用いて放線菌のゲンムDNA等からクローニングするこ
とにより得ることができる。このようにして得られたト*

* ランスグルタミナーゼの構造遺伝子及び5'末端上流部
分を含むDNAの塩基配列の一例を第4表に示す。

【0019】

【表10】

第4表

ATCCCTATA CCCGGGAGGC TCTCGTCTTC CCTCACTATGA GTGCCGTTTA TOCACCCCG
GATTCATGCC GTGGGGGGCG GAGGGGGCGG CCGACAATGG CCCGGGGAA GAGACGAAGT
CCTACCCCGA AACCTACCGC CTCAAGGGCG ATGACGTGGC GACATCAACG CGCTCAACCA
AGCCCTCCCG CGCCCTTCGAG CGCCGGGGCGG TCGTTCCCGG CGCCGGACTC CGACGGACAG
GTCAACCCCTC CGCCCGAAGC CGTCGACAGG ATGCCGACACG CGTACCGTCC CTCCGACCGC
AGGGCCGAGA CGGTGCTCAA CAACTACATA CGCAAGTGGC ACCAGGTCTA CAGCCACCC
GACGGCAAGA ACCACCGAGT GACCGAGGAG CAACCCGGT GGTGTCCTA CGGCTGGTGC
GGTGTACCT GGGTCAATTG CGCTCACTAC CCTACCGAACAA GACTGGCTT CGCGTCTTC
GACGGAGACA GGTTCAGAA CGAGCTGAAG AACGGCAGGC CGCCGGTCCCG CGAGACGGCG
GCCGAGTTCC AGGGGGGGCGT CGCGAAGGAG AGCTTTCATG AAGAGAAGGG GTTCCAGGGC
GCCGGTGGAG TGGCTCCGT GATGAAACAGG CCTCTGAGA ACCGGCACGA CGAGACGGCT
TACCTCGACA ACCTCAAGAA CGAACCTGGG AACGGCAACG CGCCCTGGC CAACGAGGAC
GCCGGTCCC CGTTCTACTC CGCGCTCGG AACACCCCGT CCTTTAAGGA CGCGAACCGA
CGCAATCAAG ACCCGTCCAG GATGAAAGGC GTCATCTACT CGAACACATT CTGGACCCCG
CAAGACCGT CGAGTTCCGG CGACAAGAGG AAGTACGGG ACCGGGAGGC TTGGGGGGCG
GCCGGGGGA CGCGCTCGGT CGACATGTCG AGGGACAGGA ACATTEGGG CACCCCGACC
AGGGGGGGTG AGGGATTGCGT CAATTCGAC TACCGCTGGT TCGGGGGCCA GACGGAACCG
GACGGGACA AGACCGTCTG GACCCACGGG AATCACTATC ACCGGGGCAA TGGCAGGCTT
GGTCCCATCC ATGTATACGA GACCAAGTTC CGCAACTGGT CGGAAGGTTA CTCCGACTTC
GACGGGGAG CCTATGTGAT CACCTTCATC CCCAAGAGCT GGAACACCCC CGGGACAAG
GTAAACACCG GCTGGCCG

本発明はまた、ランスグルタミナーゼの発現分泌用に
使用することのできるベクターを提供するものである。
【0020】かかるベクターは、所望の発現系に応じた
公知の発現用ベクターに、第1表ないし第4表に示す塩
基配列を含むDNAを従来公知の方法によって挿入する
ことにより調製することが可能である。

【0021】本発明の発現分泌ベクターの調製に用いる
ことのできる公知の発現ベクターとしては、例えば大腸
菌宿主用としてPIN-III-amp_R等を挙げることがで
きる。PIN-III-amp_Rに本発明のDNAを組込んで
得られた本発明の発現分泌ベクターの一具体例としては
pOMPA-BTGがある。さらに、放線菌宿主用として、pIJ7
02、酵母宿主用として、pNJ1053が挙げられる。これら
の発現ベクターに本発明のDNAを組み込んで得られた
本発明の発現分泌ベクターの具体例としてはpIJ702-BT
G、pNJ1053-proBTG、pNJ1053-BTGがある。

【0022】更に、本発明は、ランスグルタミナーゼ
遺伝子を担持する発現分泌ベクターを導入することによ
り得られた形質転換された種々の形質転換体に関する。

【0023】該形質転換体となり得る細胞には、大腸菌
及び放線菌等の原核細胞並びに酵母等の真核細胞が考
え

30 られる。

【0024】大腸菌の一具体例としてはJA221株(hs^r,
trpE^r, leuB6, lacY, recA/F^r, lacI^r, lac^r,
pro^r)がある。

【0025】かかる大腸菌JA221株に本発明のベクタ
ーであるpOMPA-BTGを導入することにより形質転換して
得られた形質転換体AJ12569は、平成2年9月28日付で
工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されている(受
託番号FERM BP-3558)。

【0026】放線菌の一具体例としてはStreptomyces
lividans 3131からチオストレプトン感受性株として得
たStreptomyces lividans 3131-TSがある。

【0027】かかるStreptomyces lividans 3131-TSに
本発明のベクターであるpIJ702-BTGを導入することによ
り形質転換して得られた形質転換体Streptomyces livid
ansAKW-1は、平成3年9月30日付で工業技術院微生物
工業技術研究所に寄託されている(受託番号FERM BP-
3586)。

【0028】酵母の一具体例としてはSaccharomyces c
erevisiae KSC22-1C(MAT_a, ss11, leu2, his^r, ura
3)がある。

【0029】かかる *Saccharomyces cerevisiae* KSC 22-1C に本発明のベクターである pNJ1053-proBTG を導入することにより形質転換して得られた形質転換体 *Saccharomyces cerevisiae* AJ 14669 は、平成3年9月30日付で工業技術院微生物工業技術研究所に寄託されている（受託番号 FERM BP-3585）。

【0030】最後に、本発明は、上記の形質転換体を培養することにより、トランスクルタミナーゼ活性を有するタンパク質を製造する方法に関する。

【0031】培養条件は、形質転換体の種類に応じて当業者が適宜決定し得るものである。また必要に応じて P T G 等の物質を培地に添加することにより、所望遺伝子の発現を誘導することもできる。発現分泌された該タンパク質は、培養上清及び宿主細胞のペリプラズム更には細胞質中から従来公知の種々の方法で単離・精製することが可能である。

【0032】以下、実施例を参照しつつ、本発明を更に詳しく説明する。

【0033】

【実施例】

実施例1：BTG遺伝子のクローニング

（1）菌体の取得

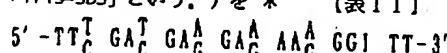
放線菌 *Streptovorticillium* sp. を以下の培地条件で 30 °C で 5 日間培養した。

【0034】[GP培地]

グリセロール	0.4 wt%
ペプトン	0.1 wt%
イースト・エキス	0.4 wt%
硫酸マグネシウム	0.05 wt%
リン酸一カリウム	0.2 wt%
リン酸二ナトリウム	0.5 wt%
グリシン	0.1 wt% / 1 l

（2）菌体からのDNAの取得

上記条件下で培養したのち、培養培地 400ml を遠心分離 (12,000g, 4°C, 10分間) し、これを 50mM Tris-HCl (pH 8.0)-5mM EDTA-50mM NaCl (以下「TES」という。) に懸濁した。次のこの懸濁液を、遠心分離 (1,100 g, 室温, 10分間) し、上清を捨てた。得られた沈殿 (菌体) を 2 mg/ml のリゾチーム (シグマ社) を含む TES 5ml に懸濁し、これを 37°C で 1 時間インキュベート 40 した。インキュベート後、これをアセトニードライアイス中につけ急激に凍らせ、42ml の 100mM Tris-HCl (pH 9.0)-1% SDS-100mM NaCl (以下「Tris-SDS」という。) を *



(20mer, 32mer, l=1)

【0040】次に 325番目のリジンから 331番目のプロリンに相当する塩基配列を予想し、同様にDNAを合成した。このDNAをPCRのPrimer #2とした。Pri

* 加え、よく懸濁した。更にこれを 60°C で 20 分間インキュベートし、アセトニードライアイス中に 10 分間つけた。次にこれを再度 60°C でインキュベートしたのち、これを Tris-SDS で飽和したフェノールで抽出した。この抽出を 2 回繰り返して、得られたものに 2 倍容量のエタノールを加えた。このとき、菌体のDNAは糸状となるので、これをガラス棒で巻き取り回収した。回収したDNAを 80% エタノールで 1 回洗浄し、アスピレーターとデシケーターを用いて乾燥した。乾燥後DNAを 10mM Tris-HC 1 (pH 8.0)-1mM EDTA (以下「TE」という。) 5ml に溶かした。

【0035】次にDNAサンプル中のRNAを分解し除いた。RNAの分解はDNAを 5ml のTEに溶かしたサンプルに、RNase A (シグマ社) 1mg/ml 及びRNase TI (ベーリングマンハイム社) 2000 u/ml を含む溶液を 0.5ml 加え 37°C で 30 分間インキュベートすることにより行なった。インキュベートの後、サンプルを TE 飽和フェノール・クロロホルムとクロロホルムで 1 回ずつ抽出し、最後に得られた水層に 1/10容量の 3M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) 溶液と 2 倍容量のエタノールを加え、-80°C に 30 分間おいた。その後、遠心分離 (12,000g, 4°C, 15 分間) により沈殿を回収し、沈殿を 70% エタノールで洗浄し、乾燥させた。これを TE 4ml に溶かし以下の実験に使用した。最終的に得られたDNA量は約 4 mg であった。

【0036】(3) PCR (Polymerase Chain Reaction) 法によるDNA断片の取得

BTG遺伝子を含む特定のDNA領域を、最近開発されてきたPCR法によって、単離増幅した (Saiki, R.F. et al. (1985) Science 230, 1350-1354, Mullis, K.B. 及び Faloona, F.A. (1987) Methods in Enzymology, 155, 335-350)。

【0037】(i) PCR 法に用いた Primer DNA の合成
大阪大学蛋白質研究所、下西研究室において決定された、BTG蛋白のアミノ酸配列の 117番目のフェニルアラニンから 123番目のフェニルアラニンに対応する塩基配列を予想し、DNAを合成した。(DNA合成は、ミリジョン・バイオサーチ社のサイクロンプラスDNA合成機を使用した。)

このDNAをPCRのPrimer #1とした。

【0038】Primer #1 の配列を以下に示す。

【0039】

【表11】

mer #2 の配列を以下に示す。

【0041】

【表12】



【0042】合成したDNAはそれぞれ20μMの濃度になるようにTEに溶解した。

【0043】(ii) PCR法によるDNA断片の増幅
反応は、(株)バーキンエルマージャパン社のGene AmpTM kitを用い、同社のDNA Thermal Cycler (DNA*)

*増幅装置により行なった。反応溶液の組成は以下の通りである。

【0044】
【表13】

(終濃度)	
H ₂ O	53.5μl
[10x] Reaction buffer	10μl [1x]
dNTPs, Mix 1.25mM	16μl 200 μM
(i) のPrimer #1	5μl 1.0 μM
(i) のPrimer #2	5μl 1.0 μM
* template(BTG DNA 0.5μg)	10μl
AmpliTaq TM DNA polymerase	0.5μl 2.5u/assay
計	100 μl

* (2) で得たDNAを0.5μg/10μlになるようにTEにとかしたもの。

【0045】上記の反応液100μlを混合し、ミネラルオイル(Sigma社)100μlを加えた。次に反応液の入ったチューブをDNA thermal Cyclerにセットし、以下の条件で反応を行なった。

【0046】95°C 1分
37°C 2分
72°C 3分

この条件下で反応を35サイクル行なった後、更に72°Cで7分間インキュベートした。

【0047】(iii) 増幅されたDNAの回収

反応後、ミネラルオイルを除き、100μlのクロロホルムを加え、混合し、15,000回転/分、2分間の遠心分離(トミー精工社製)を行ない、上清を100μl回収した。このうち10μlを用い、1.5%アガロース電気泳動で回収されたDNAのサイズと量を確認した。その結果645 bpのDNA断片が、約2 μg増幅されていることがわかった。

【0048】残りの90μlを1.5%低融点アガロース電気泳動にかけ、645 bpに相当するバンドを切り出し、65°Cでとかした後等量のフェノールを加え混合し、遠心後、水層部分をさらにフェノール/クロロホルム及びクロロホルムで順次処理した後、水層に3M酢酸ナトリウムを8%になるように加え、エタノールを2倍量加え、-80°Cで15分間置いた。次に15,000回転/分、10分間4°Cの遠心後、沈殿を20μlの水にとかした。この操作で約1 μgのDNA断片が回収された。

【0049】(4) PCRで増幅されたDNAの構造確認

上記のPCRで増幅されたDNA断片がBTG遺伝子の一部であるかどうかを確認するために、このDNA断片0.4μgを用いてダイレクトシーケンスを行なった。その方法は下記に示すもので、シーケンスのプライマーは

PCRに用いた前述のものを用いた。

【0050】-準備-

1. DNAシークエンシング用試薬: 基本的にはdideoxy法を用いた。米国USB社のシークエンス用キットであるSequenaseTM (version 2.0)を使用した。

【0051】2. シークエンシングのためのプライマーの標識: PCR反応に用いたprimer #1を2 pmol用意し、T4 Kinase(TOYOBO)で5'末端を[³²P]で標識した(比活性3000Ci/mmolの[γ -³²P] ATPを用いた)。標識したプライマーから適当なミニカラムなどを通してフリーの[γ -³²P] ATPを除いた。

【0052】3. シークエンス反応液(3.25μl中): Sequenase Kitを用いて4本のチューブに各G, A, T, C反応用のものを別々に調製した。

【0053】2.5 μl G,A,T,C,termination mix

0.38μl 5×buffer

0.22μl 0.1M DTT

0.15μl Sequenase (2ユニット)

-反応-

1. 0.4μgの増幅したDNAと2 pmolの[³²P]標識したプライマーを12μlのTEに溶かし、95°Cで5分間熱変性した後、氷水中で急冷した。

【0054】2. 直ちに(1)の溶液を2.8μlずつ4本のチューブに取り、3.25μlの各シークエンス反応液を加えて37°Cで10分間インキュベートした。4 μlの反応停止液を加え、75~80°Cで2分間加熱した後シークエンスゲルで泳動した。

【0055】ダイレクトシーケンスの結果、この断片にBTGのアミノ酸配列の129番目のパリンから149番目のアスパラギンまでのアミノ酸配列をコードする塩基配列が見出された。したがって、この断片はBTG遺伝子の一部と推定された。

〔0056〕(5) PCRで増幅されたDNA断片のpUC19へのサブクローニング

次にPCRで増幅されたDNA断片をpUC19のSmaIサイトへサブクローニングした。そのためにまずPCRで得られたDNA断片の両末端を平滑化した。平滑化反応はBlunting kit(宝酒造)を用いて下記のように行なった。

〔0057〕1. ミクロ遠心チューブに以下の反応液を調製し、全量を9μlにした。

〔0058〕DNA断片 8μl (0.4μg) 10

10×buffer 1μl

2. DNA末端のアニーリングを防ぐため、70°Cで5分間保温した後、37°Cの恒温槽に移した。

〔0059〕3. T4 DNA polymeraseを1μl加え、ビベッティングにより穂やかに混和した。

〔0060〕4. 37°Cで5分間保温した。

〔0061〕5. DNA dilution bufferを最終濃度1μg DNA/50μlになるように加え、ボルテックスで激しく攪拌した。

* 〔0062〕得られたDNA断片をpUC19をSmaIで切断したものと、ライゲーションを行ない、大腸菌DH5 α を、5-ブロモ-1-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトシド(X-gal)及びイソプロピル- β -D-チオガラクトシド(IPTG)存在下で形質転換した。アンビシリン耐性白色コロニーから得られた、PCRで増幅されたDNA断片がSmaIサイトに組み込まれたプラスミドをpUC19 BTCと名付け以下の実験に使用した。なおライゲーションには、ライゲーションキット(宝酒造)を用いた。

〔0063〕次に、PCRで増幅されたDNA断片のより広範囲の塩基配列を知るために、上記pUC19 BTCを録型として、DNAシーケンスを行なった。DNAシーケンスは7-deaza dGTP仕様のシーケネースキット(USB社)を用いる従来公知の方法で行なった。その結果、以下の第5表に示す564bpの塩基配列が明らかとなった。

〔0064〕

〔表14〕

第5表

TCCGTGATGA ACAGGGCCCT GGAGAACCCC CACGACGAGA GCGCTTACCT CGACAAACCTC
AAGAAGAAC TCCGGAACGG CAACCGACCC CTCCCAACG AGGAGGCGG TTCCCCGTTTC
TACTCCGCCCT TCCGGAACAC CGCGTCCTTT AAGGACCGGA ACGGAGGCAA TCACGACCCG
TCCAGGATGA AGCCCCGTAT CTACTCGAAG CACTTCTGGA GCGGCCAGGA CGGGTCGAGT
TCCCGGACA AGAGGAAGTA CGCGGACCCCG GACGGCTTTCC GCCCCGGCCCC CGGACCCCG
CTCGTCGACA TGTGAGGGA CAGAACATT CGGCCGACCCG CCACCAAGCCCC CGGTGAGGCA
TTCGTCAATT TCGACTACGG CTGGTTCGGG CGCCAGACGG AAGCGGACCC CGACAAGACCC
GTCTGGACCC ACGGAAATCA CTATCACCGG CGCAATGCCA CGCTTGGTCC CATCCATGTA
TACGGAGCCA AGTTCCCAA CTGGTCCGAA GTTACTCGG ACTTCGACCG CGGAGCCTAT
GTGATCACCT TCATCCCCAA GAGC

(6) ライブラーの作製

1. Streptomyces sp. 染色体DNAの部分分解
・ 染色体DNA 24μg、BamHI 10×buffer (TOYOBO10×High buffer) 60μlに滅菌水を加えTotal 594μlとし、混合した。

〔0065〕・ 37°Cで5分間予熱した。

〔0066〕・ BamHI(TOYOBO製)を6μl加え、混合し、37°C、10分間反応した。

〔0067〕・ 65°C、15分間熱処理し、酵素を失活させた。

〔0068〕2. クローニング (STRATAGENE製EMBL3 CLONING KIT 使用)

i) ligation

・ 上記DNA部分分解物25μlをエタノール沈殿し、2.5μlのTEに溶解した。

〔0069〕・ 1.0μl EMBL3 predigested arms (1μg/μl), 0.5μl 10×ligationbuffer, 0.5μl 10mM ATP(pH 7.5), 0.5μl T4 DNA ligase(8 units/μl, Boehringer Mannheim 製)を加え混合し、4°Cで一晩反応した。

〔0070〕10×ligation buffer

500mM Tris-HCl, pH 7.5

70mM MgCl₂

10mM DTT

ii) Packaging (STRATAGENE製GIGAPACK II COLD PACKAGING EXTRACT使用)

1. 適当量の抽出物を-70°Cのフリーザーからドライアイス上に移し、同時に、音波抽出物を溶かし始めた。

〔0071〕2. 指の間で、調度融け始めるまで凍結/融解抽出物を暖めた。

〔0072〕3. 凍結/融解抽出物に上記DNA溶液4μl (1.6μg含有)を加え氷上に置いた。

〔0073〕4. DNAを含む凍結/融解抽出物に速やかに音波抽出物15μlを加えた。

〔0074〕5. 泡立たないように攪拌し良く混合した。

〔0075〕6. 4,000 gで5秒間遠心し、内容物全てをチューブの底に集めた。

〔0076〕7. 室温(22°C)で2時間インキュベートした。

【0077】8. ファージ希釈用バッファー 500μl を加えた。

【0078】9. クロロホルム20μl を加え、静かに混合した。10. 4,000 gで5秒間遠心し、デブリスを沈降させた。

【0079】11. 上清を集め4°Cで保存した。

【0080】ファージ希釈用バッファー (11当り)

5.8 g NaCl
2.0 g MgSO₄
50ml 1M Tris-HCl, pH7.5
5ml 2% gelatin
autoclave
iii) plating

1. 大腸菌P2392 をTB培地に接種した。

【0081】P2392 の性状はhsd R514(rk-, m^k+) sup E 44, sup F58, lacY1, orΔ(lac IZY), gal K2, gal T2, met B1, trp R55, (P2). またTB培地の組成は、5g / 1 NaCl, -10g / 1 Bactotryptoneである。

【0082】2. P2392 をTB培地中で37°Cで振盪培養した。

【0083】3. OD₆₀₀ = 0.5 で、菌体を遠心分離(1, 100g, 15分間、室温)により集めて、10mM MgSO₄ にOD₆₀₀ = 0.5 となるように懸濁した。

【0084】4. (ii)-11 の上清を少量加え、37°C15分間インキュベートした。

【0085】5. あらかじめ溶かしてあたためておいた top agarose (NaCl 5g / 1, MgSO₄ · H₂O 2g / 1, Ye ast Extract 5g / 1, NZ Amine 10g / 1, Agarose 0.7 %) 8mlと混合し、NZYプレート上に重層した。 (NZY プレート: NaCl 5g / 1, MgSO₄ · H₂O 2g / 1, Ye ast Ext 5g / 1, NZ Amine 10g / 1, Agar 15g / 1)。

【0086】6. 37°Cで1晩インキュベートした。

【0087】この結果 3.0×10⁴ インデペンデントクローンよりなるライプラリーが作製できた。

【0088】(7) BTG遺伝子のスクリーニング (6) で得られたライプラリーを用いてBTG遺伝子のクローニングを行なった。 (6)-(iii)に示した方法で、ライプラリー中のファージのブレーティングを行なった。一晩37°Cで培養後、ブラークを形成させ、ファージのリフティングを行なった。ファージのリフティングは次のように行なった。

【0089】1. プレートを4°Cに数時間おいた。

【0090】2. プレート表面(トップアガロース表面)にニトロセルロースフィルターを密着させた(ニトロセルロースフィルター (S & S))。

【0091】3. そのまま約2分間放置した。

【0092】4. ニトロセルロースフィルターをはがし、0.5M NaOH-1.5M NaCl に1分間浸した。

【0093】5. ニトロセルロースフィルターを1.5M NaCl-1M Tris-HCl (pH7.5) に5分間浸した。

【0094】6. ニトロセルロースフィルターを2×SSC (1×SSC = 0.15M NaCl 0.015M Na-Citrate, pH7.0) に30秒間浸した。

【0095】7. 3MM口紙上でニトロセルロースを風乾した。

【0096】8. 3MM口紙にはさみ、80°Cで2時間Bakingを行なった。

【0097】リフティングを行なった後、pUC 19 BTGの EcoRI, HindIII で分解して得られる650 bpのフラグメントを³²Pでラベルしたものをプローブとして用いて、ハイブリダイゼーションを行なった。このEcoRI, Hind III で分解して得られる650bpのフラグメントは、PCRにより増幅されたDNA断片を完全に含んでいる。また、フラグメントの³²Pの標識はマルチプライムDNA標識セット(アマチャム)を用いて行なった。プローブの比活性は 3×10⁶ cpm/μg-DNAであった。ハイブリダイゼーションの条件は以下の通りであった。

【0098】プレハイブリダイゼーション: ハイブリダイゼーション溶液 (50%ホルムアミド、1×Denhardt's (0.02% BSA, 0.02% Ficoll, 0.02% ポリビニルビロリドン)、0.1%SDS, 50mMリン酸ナトリウムバッファー (pH 6.5), 200μg/μl 1変性サケ精巣DNA) 中42°C, 1晩インキュベートした。

【0099】ハイブリダイゼーション: ハイブリダイゼーション溶液中で、プローブ濃度を2 ng/mlとして、42°Cで、1晩インキュベートした。

【0100】洗浄

1. 2×SSC, 0.1% SDS 5分×3回、室温

2. 1×SSC, 0.1% SDS 1時間×2回、68°C

洗浄後ニトロセルロースフィルターを風乾し、オートラジオグラムをとった。

【0101】以上の一連の操作で、初めに約4万個のブラークについてスクリーニングを行なった(ファーストスクリーニング)。この結果16個の強いシグナルを示すクローンを得た。これらのクローンをシングルブラークとして得るために、これら16個のクローンについて更にスクリーニングを行なった。この結果8個のシングルブラーク化された、強いシグナルを示すクローンを得た。

【0102】(8) クローンDNAの構造解析
得られた8つのクローンのDNAの構造を調べるために、6つのクローンよりDNAを調製した。DNAの調製法は "Molecular, Cloning, a laboratory manual 2nd Edition" に従って行なった。

【0103】このようにして得られたDNAから制限酵素 BamHI, SphI, NcoI, BglII, KpnI (いざれもTOYOBO) を用いて制限酵素地図を作製した。その結果、これらのクローンは、ほぼ同一のDNA断片を含んでおり、その制限酵素地図は第1図のように決まった。

【0104】次に、それぞれの制限酵素でDNAを切断

し、電気泳動し、DNAをニトロセルロースフィルターに固定し、先にBTG遺伝子のスクリーニングで用いたプローブを用いてサザンハイブリダイゼーションを行なった。ハイブリダイゼーションの条件はBTG遺伝子のスクリーニングで用いた条件と同じとした。

【0105】その結果、プローブにハイブリダイズして強いシグナルを与えるのはマップ上のNcoI 3.6kbp断片であることがわかった。したがって、少なくともBTG遺伝子の一部はNcoI断片にあると考えられた。

【0106】(9) NcoI 3.6kbp断片のサブクローニング

次に、NcoI 3.6kbp断片をプラスミドにサブクローニングすることにした。得られたファージクローンのDNAをNcoIで切断し、3.6kbpのDNA断片を低融点アガロースを用いて回収した。このNcoI断片を、プラスミドpTV118N(宝酒造)をNcoIで切断したDNAとライゲーション*

*ンさせ、このDNAで大腸菌DH5 α を形質転換した。得られた形質転換体より、pTV118NにNcoI 3.6kbp断片がサブクローニングされたプラスミドpTV118 NcoIを得た。

【0107】(10) BTG遺伝子のDNAシーケンス
得られたpTV118 NcoIを鏡型として、DNAシーケンスを行なった。その方法は(4)の項で説明した手法と同様の方法を用いた。ただしここでは反応温度を48°Cとし、更にシーケンスのコンプレッションの程度によっては反応系にSSB(Single Stranded DNA Binding Protein; TOYOBO)を加えた。

【0108】下記の第6表に求められた塩基配列を示す(配列番号3)。

【0109】

【表15】

第 8 表

TGCGGGGAGG CGTAGGCAAT GGGGGTTCAAT CGCGGACGTGCG TTCCGGACGG CGCGCGTTCAA

CGATGTTCCA CGACAAAGGA GTTCAAGGTT TCCATCCGCT ATACCCCGA CGCTCTCGTC
TTCCCGACTA TGAGTCCCGT TTATGCACCG CGCGATTCAAT CGCGTCGGCC CGCGAGCGCG
CCCGCGACAA TCCCGCCCGG GAAGAGACCA ATGCCCTACGC CGAAACCTAC CGCCCTACCG
CGGATGAGT CGCCACATCA CGCCGCTCAA CGAAGGGCTC CGCCCGCTTC GACGGCCGCC
CCGTCGTTCC CGCCCGCCCGA CTCCGACCGAC AGGGTCACCC CTCCCGCCGA CGCCCTCGAC
AGGATGCCCG ACCCGTACCG TCCCTCGTAC CGCACGGCG AGACGGTCGT AAACAACTAC
ATACCGAAGT CGCACCAAGT CTACACACAC CGCGACGCCA CGAACAGCA GATGACCGAG
GACCAACGGG AGTGGCTGTC CTACGGCTCC GTCGGTGTC CCTCGGTCAA TTCCGGTCAG
TACCCGACGA ACAGACTCGC CTTCGGGTCC TTGGACGGAGG ACAGGTTCAA GAACGGACGTG
AAGAACGGCA CGCCCGCCGT CGCGGAGAGT CGAACGGCC CGTCCGGAG

GAGACCTTG ATGAAGAGAA CGCGTTCCAG CGCGCCCGTG AGGTGGCGTC CGTGATGAAC
ACGGCCCTCG AGAACGCCCA CGACGAGAGC CCTAACCTCG ACAACCTAA GAAAGAACATG
CGGAACGCCA ACCACGCCCT CGCGAACAGG CGACCGCTT CGCCGTTCTA CTCCGGCTG
CGGAACACCC CGTCCCTTAA CGAGCGGAAC CGAGGCAATC ACCACCCGTC CAGGATGAAG
CGCCGTATCT ACTCGAACCA CTTCGGAGC CGCCAGGACC GTTCGAGTTC CGCCGACAAG
AGGAAGTACG CGCACGGGA CGCTTCCCG CGCGCCCGG CGACGGCCCT CGTCGACATG
TCGAGGACA CGAACATTCC CGCACGGCCC ACCACGGCG AGTGAAGGATT CGTCATTTTC
GACTACGGCT CGTCCCGCC CGACACGAA CGCGACGGCG ACAACACCGT CTGGACCCAC
CGGAATCACT ATCACGGGCC CAATGGCCAC CTGGTGCA TCGATGTATA CGAGACCAAG
TTCCGCAACT CGTCCGAAGG TTACTCCGAC TTGGACGGCG GAGCTATGT GATCACCTTC

ATCCCCAAGA CGTGGAAACAC CGCCCCCGAC AAGGTAAGC AGGGCTGGCC GTGATGTGAG
CG

塩基配列よりBTG遺伝子の開始コドンは1位のATGと推定された。その理由は、(a) 1位の81b上流にストップコドンが存在し、BTG遺伝子のオープンリーディングフレームはこの位置より下流から始まると考えられる；(b) 1位のATGの13b上流には典型的なSD配列(5' - AAACGAG - 3')が存在する；(c) 1位の

ATGのメチオニンから約20アミノ酸の領域は比較的疎水性に富んだ部分で、シグナル配列様の配列を持つ；という以上の3点からである。

【0110】また、3'末側の1219位にはストップコドンが存在しておりBTGのC末は1216位のプロリンと考えられる。塩基配列より求められたオープンリーディン

グフレームで、アミノ酸シーケンスで求められたB T GのN末端のアミノ酸の位置は226位のアスパラギン酸である。したがって、ここで求められたB T G遺伝子のオープンリーディングフレームはアミノ酸シーケンスから求まつた構造に更に75個のアミノ酸が付加した構造をとっていることがわかった。

**[0111] 実施例2：B T G遺伝子の化学合成
B T G遺伝子の設計合成**

前述の如く、明らかになつたB T Gの全アミノ酸配列をもとに、B T G遺伝子DNAを設計した。その際、大腸菌や酵母のコドン使用頻度(Ikemura, T. and Ozeki, H., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 47, 1087(1983))を考慮し、また、各フラグメント(1)～(5)の両端のDNA鎖には各フラグメントの集合連結させる時に用いる制限酵素の認識部位を配置した。

[0112]

[表16]

(1)	5' - AATTC.....GTTAAC - 3' 3' - G.....CAATTGTTGGA- 5' EcoRI SphI Bpu11I
(2)	5' - AATTCGTTAAC.....TCTAGAA - 3' 3' - GCAATTG.....AGATCTTTCGA- 5' EcoRI SphI Bpu11I
(3)	5' - AATTCCTCTAGA.....AGATCTA - 3' 3' - GAGATCT.....TCTAGATTCGA- 5' EcoRI SphI Bpu11I
(4)	5' - AATTCCAGATCT.....CCATGGA - 3' 3' - GTCTAGA.....GGTACCTTCGA- 5' EcoRI SphI Bpu11I
(5)	5' - AATTCCCATGG.....A - 3' 3' - GGGTACC.....TTGGA- 5' EcoRI SphI Bpu11I

30

* ズ社のDNA合成機380Aを用いてホスホアミダイト法で化学合成した。

[0113] 現在のDNA合成機やDNA精製法の信頼性、操作性から判断して、1本あたりのDNA鎖は30～40塩基程度にした。まず、当該B T Gは331アミノ酸、即ち、993塩基の遺伝子が少なくとも必要である。また2本鎖としてプラスミドに組み込む必要があるのでその2倍のDNAを合成する必要がある。実際には終止コドンの導入や、各断片の連結のための制限酵素認識部位も必要なため、27本表裏で合計54本のDNA鎖を合成した。またプラスミドに組み込んだところで、塩基配列の確認が必要なので確実に塩基配列の決定が行なえる長さ(約200 bp)に分けてプラスミドに組み込む方が操作しやすい。

[0114] したがつて遺伝子全体を一度に組み立てるのではなく、約200bpずつ5つのブロックに分けて最初のフラグメントの集合を行ない、そこで塩基配列の確認を行なつてから全体を構築することにした。

[0115] B T G遺伝子(合成型)の構築

まず、5ブロックに分けた各フラグメント(約200 bp)の構築を行なつた。化学合成によって得られるオリゴヌクレオチドの5'末端にはリン酸がついていないので、ポリヌクレオチドキナーゼを用いて5'末端にリン酸をくっつけた。その際、各フラグメントの5'両末端に位置するDNA鎖のリン酸化は連結後に行なつた。

[0116]

次に設計した遺伝子DNAをアプライドバイオシステム*

各オリゴヌクレオチド100pmole

(水中)	7.5 μ l
10x バッファー*	1 μ l
10mM ATP	1 μ l
ポリヌクレオチドキナーゼ(宝酒造)	0.5 μ l(5ユニット)
	10 μ l

* 10xバッファー
650mM Tris-HCl(pH7.6)
100mM MgCl₂
150mM ジチオスレイトール
10mM スペルミジン

上記組成をエッペンドルフチューブに入れ、37°C、1時間反応させた後、3分間煮沸により酵素を失活させた。次に相補的な対同志を5 μ lずつ混合し(トータル10 μ l)、90°Cの湯浴中に3分間煮れたあと、自然に37°Cま

※で湯の温度を下げてアニーリングを行なつた。そのあと、2対のDNA(20 μ l)の隣どうしをリガーゼを用いて連結した。

[0117]

20 μ l
150mM ジチオスレイトール(DTT) 2 μ l

21

10mM ATP

リガーゼ(宝酒造)

2 μ l0.5 μ l (150ユニット)24.5 μ l

上記組成をエッペンドルフチューブに入れ、16°C、30分間反応させた後、さらに隣どうしを連結して、プロックをつなぎ合わせるため、上記反応液の各22 μ lずつを3本混合し(トータル66 μ l)、リガーゼ0.5 μ lを加えた。16°C、30分間反応後、10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行ない、約200 bpのDNAフラグメントをゲルから回収した。

【0118】こうして得たDNAフラグメント(1)～(5)の5'末端にはEcoRI認識部位、3'末端にはHindIII認識部位がある。次に各フラグメントの5'両末端のリン酸化を行なった後、適当量をあらかじめ EcoRIと HindIIIで切断処理したプラスミドpUC18(Yanisch-Perron, C.等、Gene, 33, 103(1985))と混合し、ライゲーションキット(宝酒造)を用いて16°C、1時間連結反応を行なった。

【0119】次にこの各混合物を大腸菌JM109株(reCA1, Δ lacpro, endA1, gryA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, λ^- , (F' traD36, proAB, lacI $^+$ Z Δ M15))に導入した。

【0120】E.coli JM109株はpUC系プラスミドDNAの形質転換やM13ファージベクターDNAの形質導入を行なう際に、ベクターDNAより生成するTacZ α ペプチドとJM109F'にコードされるlacZ Δ M15による β -ガラクトンシダーゼの活性回復を用いて、組換え体の選別を容易にする菌株である。即ち、IPTG(イソプロピル- β -D-チオガラクトビラノシド)とX-Gal(5-ブロモ-4-クロロ-3-インドール- β -D-ガラクトシド)を含む培地でプラスミドpUC18を保持するJM109株は、 β -ガラクトンシダーゼ活性を示す青色のコロニーとして出現するが、外来DNA断片が挿入された組換えプラスミドを保持するJM109株は β -ガラクトンシダーゼ活性が回復せず無色のコロニーとして出現する。

【0121】いくつかの無色のコロニーから、プラスミドを調製し、そのDNAシークエンシングを行ない(Sanger, F.ら、J.Mol.Biol., 143, 161(1980))、挿入された各フラグメントが設計した通りの正しい塩基配列を有するクローンを選択した。

【0122】さらに、各制限酵素認識部位をもちいて各フラグメントの連結を行なった。

【0123】まずフラグメント(2)と(3)の連結は、pUC18のアンビシリントリプトニン耐性遺伝子内に存在するScaI認識部位を利用して、フラグメント(2)及び(3)をScaIとXbaIで切断後、BTG遺伝子を含むScaI-XbaI断片を用いて行なった。またフラグメント(4)と(5)の連結は同様にフラグメント(4)及び(5)をScaIとNcoIで切断後、BTG遺伝子を含むScaI-NcoI断片を用いて行なった。さらにフラグメント(2)(3)(4)(5)の連結は同様にフラグメン

22

2 μ l0.5 μ l (150ユニット)24.5 μ l

ト(2)(3)集合体及び(4)(5)集合体をScaIとBglIIで切断後、BTG遺伝子を含むScaI-BglII断片を用いて行なった。

【0124】最後に、フラグメント(1)のEcoRI-HpaI断片とフラグメント(2)(3)(4)(5)の集合体のHpaI-HindIII断片をあらかじめ EcoRIと HindIIIで切断処理した大腸菌用高発現分泌ベクターpIN-III-ompA2(Ghrayeb, J.等、EMBO J., 3, 2437(1984))と混合し、ライゲーションキットを用いて、16°C30分間連結反応を行なった。次にこの混合物を大腸菌J A 221株(hsdR $^+$, trpE5, 1eu86, lacY, recA/F', lacI $^+$, lac $^+$, pro $^+$)(Nakamura, K.等、J.Mol.Appl.Genet., 1, 289(1982))に導入した。生じたコロニーからいくつかプラスミドを調製し、BTG遺伝子(約1 kb)が正しく挿入されたことを確認した。こうして得られたBTGの発現分泌ベクターをpOMPABTGと呼ぶ。挿入された化学合成型BTG遺伝子の塩基配列を第2表に示した。

【0125】なお、この実施例で用いたプラスミドpIN-III-ompA2は大腸菌の外膜リボタンパクのプロモーター(lpp $^+$)、及びラクトースオペロンのプロモーター、オペレーター(lac o)、大腸菌の外膜タンパクOmpAのシグナルペプチドを含んでおり、この下流に組み込まれた遺伝子はIPTGの添加により発現が誘導され、遺伝子産物はペリプラズムに蓄積される。これまでにサチライシンをはじめ、いくつかの例で遺伝子産物がペリプラズムに蓄積することが報告されている(Ikemura, H.等、J.Biol.Chem., 262, 7859(1987), Hsiung, H.M.等、Bio/Technology, 4, 991(1986)など)。BTGタンパクの精製は常法どおり、ペリプラズムから浸透圧ショック法(Koshland, D.ら、Cell, 20, 749(1980))によってペリプラズム画分のタンパク質を抽出し、その後、硫酸沈殿、各種イオン交換クロマトグラフィ、ゲル通過及びHPLC等の各操作を用いる生化学的手法により行なうことができる。

【0126】また、合成したBTG遺伝子の発現に用いるプラスミドとしては、pIN-III-ompAに限らず、他の発現プラスミドを用いることもできる。これらは、発現系に応じて当業者であれば容易に選択し得る。

【0127】実施例3: BTG遺伝子(合成型)の大腸菌での発現

合成型BTG遺伝子を組み込んだプラスミドpOMPABTGを保有する大腸菌JA221株(FERM P-11745)をアンビシリントリプトニン50 μ g/mlを含むM9カザミノ酸培地で37°C、2時間振盪培養後、培養温度を23°Cに下げ、IPTGを1 mMとなるよう添加し、さらに4時間23°Cで振盪した。次いでこの培養液50mlを遠心分離により集菌後、菌体を20%シューコロース、10mM Tris-HCl(pH7.5) 2.5mlに懸濁し、

0.5M EDTA(pH8.0) 0.125mlを添加後、30分間氷中に放置した。12000 rpm、10分間遠心し、上澄と菌体を分離後、菌体画分を蒸留水3mlに懸濁し、30分間氷中に放置した。12000 rpm、10分間遠心し、上澄と菌体を分離した。次にこれらの上澄液を合わせて38000 rpm、60分間超遠心し、その上澄液をペリプラズム画分とした。

【0128】さらに菌体画分は蒸留水3mlに懸濁後、超音波破碎(200W, 5分)を行ない、細胞質画分とした。

【0129】各画分のBTG活性の測定

調製した各画分(培養上清、ペリプラズム、細胞質)のBTG活性をヒドロキサム酸法により測定した。

【0130】測定方法は基本的には、J.Biol.Chem. 241 5518(1966)に記載のFolk and Coleの方法(Colorimetric hydroxamate Procedure)に準じて行なった。すなわち、ベンジルオキシカルボニル-L-グルタミルグリシン(CBZ-gln-gly)とヒドロキシルアミンを基質としてC_a²⁺存在下あるいは非存在下で反応を行ない、生成したヒドロキサム酸をトリクロロ酢酸存在下で鉄錯体として形成させ、525 nmの吸収を測定し、ヒドロキサム酸の量を検量線より求め活性を算出する方法である。

【0131】<活性測定法>

試薬A

0.2Mトリス塩酸緩衝液(pH 6.0)

0.1Mヒドロキシルアミン

0.05M 塩化カルシウム

0.01M 遠元型グルタチオン

0.03M CBZ-gln-gly (国産化学製)

試薬B

3N 塩酸

1容

12% - トリクロロ酢酸

1容

30

5% FeCl₃・6H₂O(0.1N-HClに溶解)

1容

試料(酵素液)の0.4mlに試薬A 0.4ml加えて混合し、37°Cで、10分間反応後、試薬B 0.4mlを加えて反応停止と鉄錯体の形成を行なった後、525 nmの吸光度を測定した。

【0132】対照として、予め、熱失活させた酵素液を用いて同様に反応させたものの吸光度を測定し、酵素液との吸光度差を求め、別に酵素液のかわりにL-グルタミン酸γ-モノヒドロキサム酸を用いて検量線を作成し、吸光度より、生成されたヒドロキサム酸の量を求め、1分間に1マイクロモルのヒドロキサム酸を生成する酵素活性を1単位とした。

【0133】以下にその測定結果を示す。

*

[YEME培地+0.5%グリシン+50μg/mlチオストレブトン]

0.3% イースト・エキス
0.5% ベブトン
0.3% マルト・エキス
0.1% 塩化マグネシウム
1.0% グルコース
34.0% サッカロース

* [0134]

【表17】

試料	IPTG (m)	BTG活性 (U/mg蛋白)
培養上清	—	0
ペリプラズム	—	0
細胞質	—	0

いずれの画分にもIPTGで誘導すると微弱ながらBTG活性を検出することができた。

【0135】さらに、BTG遺伝子産物が生成していることを確認するため精製BTGを用いてウサギで作製した抗BTG抗体によるウェスタン・ブロッティングを、ベクター社のVectastain ABC kitを用いて行なった。

【0136】即ち、各画分からのタンパク 0.5μlずつをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、泳動後のゲルをメンブレン(Immobilin; ミリポア社)にトランスファーして抗原となるタンパク質をメンブレンに結合させた。その後、ウサギ抗BTG抗体(抗体価64倍のものを1000倍希釈した)によるウェスタンブロッティングを行ない、遺伝子産物をタンパクレベルで確認した。

【0137】その結果、以下の1, 3, 5及び7のレーンにおいて同一の位置に発色したバンドが現われ、いずれのIPTG添加画分でも抗BTG抗体との反応を示すタンパク質が、精製BTGと同一分子量の位置に検出できた。

【0138】1: 精製BTG(コントロール)

2: 培養上清(IPTG無添加)

3: 同上 (IPTG 1mM添加)

4: ペリプラズム (IPTG無添加)

5: 同上 (IPTG 1mM添加)

6: 細胞質 (IPTG無添加)

7: 同上 (IPTG 1mM添加)

実施例4: BTG遺伝子(天然型)の放線菌での発現

(1) ブラスミドベクター(pIJ 702)の取得

pIJ 702 含有Streptomyces lividans 3131 (ATCC 3528

7) を以下の培地条件で30°C、2日間培養した。

【0139】

25

0. 5% グリシン

0. 1% 5.0 mg/ml チオストレブトン溶液

(シグマ:ジメチルスルホキシド溶液) /1 (pH 7.0)

上記条件下で培養した培養培地 2.0 ml を遠心分離 (1,2000 g, 4 °C, 10 分間) し、得られた沈殿 (菌体) を 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)-5 mM EDTA-50 mM NaCl で洗浄した。洗浄後、遠心分離 (1,300 g, 室温, 5 分間) により得られた菌体を 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)-10 mM EDTA-25% Sucrose (以下「TE-Sucrose」という。) 1.0 ml に懸濁した。次に 3.0 mg/ml のリゾチーム (シグマ) を含む TE-Sucrose 2 ml 及び 0.25 M EDTA 4 ml を加え、これを 37 °C で 30 分間インキュベートした。インキュベート後 2.0% SDS 2 ml を加えさらに 5 M NaCl 5 ml を加え穏やかに攪拌した後、0 °C で 1 晚インキュベートした。次に、遠心分離 (100,000 g, 4 °C, 40 分間) により得られた上清に 3.0% ポリエチレングリコール 6000 を終濃度 1.0% になるように加え、0 °C で 4, 5 時間インキュベートした。その後、遠心分離 (900 g, 4 °C, 5 分間) し、沈殿を 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)-1 mM EDTA-50 mM NaCl で溶かした。そして、塩化セシウム 16.8 g 及び 1.0 mg/ml の濃度にエチジウムプロマイドを 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)-1 mM EDTA (以下「TE」という。) に溶かし調製した溶液 1.2 ml を加え、遠心分離 (1,300 g, 室温, 15 分間) により、残渣を取り除いた後、遠心分離 (230,000 g, 20 °C, 12 時間) を行なった。遠心後、紫外線照射下でプラスミド DNA 層を得た。次に TE で飽和したブタノールによる抽出を行ないエチジウムプロマイドを除いた。この抽出は、3 回繰り返して行なった。得られたものは、TE で 4 °C, 1 晚透析を行なった。その後、TE 飽和フェノールで 1 回、クロロホルム・イソアミルアルコールで 2 回抽出した。次に、1/10 容量の 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) 溶液と 2 倍容量のエタノールを加え、-80 °C に 30 分間静置した。その後、遠心分離 (12,000 g, 4 °C, 15 分間) により沈殿を回収し、沈殿を 70% エタノールで洗浄し、乾燥させ*

[P 級衡液]

TES[N-Tris(hydroxymethyl) methyl

-2-aminoethane sulphonic acid] 5.73 g

サッカロース 1.03 g

塩化マグネシウム 2.03 g

硫酸カリウム 0.5 g

塩化カルシウム 3.68 g

Trace element solution 2 ml /1 (pH 7.4)

なお、1% リン酸一カリウム溶液を別調製し、使用直前に 1.00 ml P 級衡液当たり 1 ml 加えた。

[0144] [Trace element solution]

塩化亜鉛	4.0 mg
塩化第二鉄	2.00 mg
塩化第二銅	1.0 mg
塩化マンガン	1.0 mg

26

*た。これを TE 2.00 μl に溶かした。最終的に得られた DNA 量は、約 10 μg であった。

[0140] (2) 宿主の取得

PIJ702 含有 *Streptomyces lividans* 3131 を YEME 培地で 30 °C、7 日間培養した。

[0141] 次に、培養液を YEME 培地で 10¹ ~ 10² 倍に希釈し、それぞれの希釈液を 100 μl ずつ YEME 寒天培地 (YEME 培地に 1.5% 寒天を加えたプレート寒天培地) 5 枚にまいた。そして 30 °C、1 週間培養した。培養後、RepliPlateTM Colony Transfer Pad (宝酒造) を用い、2.00 μg/ml チオストレブトンを含む YEME 寒天培地にレプリケイションし、30 °C、1 週間培養した。そして分離できたチオストレブトン感受性株 1 株を *Streptomyces lividans* 3131-TS とし、宿主として用いた。

[0142] (3) *Streptomyces lividans* 3131-TS プロトプラストの調製

(2) 得られた *Streptomyces lividans* 3131-TS を YEME 培地 + 0.5% グリシンで 30 °C、2 日間培養した。培養液 2.00 ml を遠心分離 (1,300 g, 室温, 10 分間) し、得られた菌体を 0.35 M サッカロース 7.2 ml に懸濁した。次に、この懸濁液を遠心分離 (1,300 g, 室温, 10 分間) し、菌体を 1 mg/ml のリゾチーム (シグマ) を含む P 級衡液 (下記) 6.0 ml に再懸濁し、これを 30 °C、2.5 時間インキュベートした。インキュベート後、この懸濁液を脱脂綿で通過し残渣を取り除いた。次に、得られた滤液を遠心分離 (1,300 g, 室温, 10 分間) し、P 級衡液 2.5 ml で洗浄した。この洗浄を 2 回繰り返した後、沈殿を P 級衡液 1 ml に懸濁し、プロトプラスト懸濁液とした。

[0143]

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

Streptomyces lividans 3131-TS で発現させることは、他の微生物の場合に比べて前駆体から成熟体へのプロセッシングがスムーズに行なわれるのではないかと考えた。そこで以下の様に発現型 BTG 遺伝子を構築した。

【0145】i) BTG 遺伝子シグナル、プロ領域、構造遺伝子を含む断片の取得

PCR 法により、3. 6 kbp BTG 遺伝子 NcoI 断片を録型*
Primer #3

5' - ACGAGCTCAAAGGAGTTGCAGGTTCCATGCCCTAT-3'
Sac I (36mer)

Primer #4

5' - CCGGATCCAGATCTCACATCACGGCCAGCCCTGCCTT-3'
BamH I Bgl II (36mer)

【0148】なお、PCR 法の詳細な条件は、実施例 1 と同様である。

【0149】ii) *me1* (メラニン合成遺伝子) プロモーター領域断片の取得

BTG 遺伝子の発現プロモーター領域として *me1* 遺伝子を選択した。そこで、PCR 法により、pIJ702 を録型*
Primer #5

5' - ACGAGCTCGTGGGTTGACCAACCCCC-3'
Sac I (26mer)

Primer #6

5' - ACGAATTCTGCAGTTTCGGCACGTGAGCCA-3'
EcoRI PstI (30mer)

【0152】なお、PCR 法の詳細な条件は、実施例 1 と同様である。

【0153】iii) BTG 遺伝子断片 (Mp-BTG spm) の構築

PCR で増幅された Mp 断片と pUC19 をそれぞれ Eco RI, SacI (TOYOB0) で切断したのち、目的のサイズのものを低融点アガロースを用いて回収した。次に、これらをライゲーションし、大腸菌 DH5 α を、X-gal 及び IPTG 存在下で形質転換した。そして、アンビシリン耐性白色コロニーから得られた Mp 断片が pUC19 の EcoRI-SacI サイトに組み込まれたプラスミドを pUC19-Mp とし、以下の実験に使用した。

【0154】次に、同様に PCR で増幅された BTG spm 断片と pUC19-Mp をそれぞれ BamH I, SacI (TOYOB0) で処理し、サブクローニングを行なった。こうして得られた BT★

1.4 kbp Mp-BTG spm 断片	8.5 μ l (約 500 ng)
5.1 kbp pIJ702 PstI-BglII 断片	8.5 μ l (約 500 ng)
5 units/ μ l T4 DNA ligase (ベーリンガー)	1.0 μ l
10x ligation buffer (ベーリンガー)	2.0 μ l

*として BTG 遺伝子シグナル、プロ領域、構造遺伝子を含む断片 (以下「BTG spm 断片」と言う。) を取得した。

【0146】PCR に用いた Primer #3 及び Primer #4 の配列を以下に示す。

【0147】

【表 18】

【0148】なお、PCR 法の詳細な条件は、実施例 1 と同様である。

【0149】ii) *me1* (メラニン合成遺伝子) プロモーター領域断片の取得

20 BTG 遺伝子の発現プロモーター領域として *me1* 遺伝子を選択した。そこで、PCR 法により、pIJ702 を録型*
Primer #5

【0151】

【表 19】

【0152】なお、PCR 法の詳細な条件は、実施例 1 と同様である。

★ Mp 断片が pUC19-Mp の BamH I-Sac I サイトに組み込まれたプラスミドを pUC19-Mp-BTG spm として、以下の実験に使用した。

【0155】得られたプラスミド pUC19-Mp-BTG spm は Pst I, Bgl II (TOYOB0) で処理し、1.4 kbp Mp-BTG spm 断片を取得した。

【0156】なお、ライゲーションには、ライゲーションキット (宝酒造) を用いた。

【0157】(5) BTG 遺伝子の *Streptomyces lividans* 3131-TS への導入

前項で得られた 1.4 kbp Mp-BTG spm 断片と 5.1 kbp pIJ702 PstI-BglII 断片をライゲーションした。なお、ライゲーションは、以下の反応液を調製し、4°C で 1 晩インキュベートした。

【0158】

インキュベート後、このDNAで *Streptomyces lividan s 3131-TS* を形質転換した。形質転換は下記のよう行った。

* [0159] 1. 以下の反応液を調製し、全量 140μ lにした。

* [0160]

DNA溶液

Streptomyces lividans 3131-TS プロトプラスト 100μ l
 $0.35M$ サッカロース 20μ l

2. 20% ポリエチレングリコール1000を含むP緩衝液を 1.5ml 加えビベッティングにより穂やかに混和した。

[0161] 3. 室温で2分間静置した。

[0162] 4. 速心分離 ($1,700\text{ g}$, 室温, 10分間) し、ペレットを集めた。

[0163] 5. 得られたペレットをP緩衝液で洗浄した。なお、この操作は2回繰り返した。※

* [0164] 6. ペレットを 1ml のP緩衝液に再懸濁した後に、 200μ lずつR-2培地に塗布した。

[0165] [R-2培地] 以下に示したR-2/A及びR-2/Bを別調製し、プレート培地作製時にR-2/A, R-2/Bを混合し、さらに 1% KH_2PO_4 を最終容量 200ml 当り 1ml の割合で混合した。

[0166]

R-2/A

硫酸カリウム	0. 5 g
塩化マグネシウム	20. 2 g
塩化カルシウム	5. 9 g
グルコース	20. 0 g
プロリン	6. 0 g
カザミノ酸	0. 2 g
Trace element solution	4 ml
寒天	44. 0 g / 1

R-2/B

TES	11. 5 g
イースト・エキス	10. 0 g
サッカロース	203 g / 1 (pH 7, 4)

7. 30°C で18時間インキュベートした。

[0167] 8. $200\mu\text{g}/\text{ml}$ チオストレブトン及び $400\mu\text{g}/\text{ml}$ チロシンを含むP緩衝液 1ml を加え、寒天の全表面を覆った。

[0168] 9. さらに、 30°C で7日間インキュベートした後にチオストレブトン耐性白色コロニーを得た。なお、外来DNA断片が挿入されていないpIJ702を保持するものは、m_{el}遺伝子によりメラニンを合成し、黒色のコロニーとして出現する。こうして得られたいくつかの白色コロニーからプラスミドを調製し、目的とするBTG遺伝子が挿入されているかどうか確認した。

[0169] そして得られたBTG発現分泌ベクターをpIJ702-BTGと名付けた。

[0170] (8) BTG遺伝子の発現

BTG遺伝子を組み込んだpIJ702-BTGで形質転換した放線菌を *Streptomyces lividans AKW-1* として以下の培地条件で 30°C , 5日間培養した。

[0171]

ポリベプトン	2%
可溶性デンブン	2%
イースト・エキス	0. 2%
リン酸二カリウム	0. 2%
硫酸マグネシウム	0. 1%

30 上記条件下で培養した培養培地 100ml を速心分離 ($12,000\text{g}$, 4°C , 10分間) し、得られた上清を分画分子量 1000 の限外濾過膜 (アミコン) を用いて約 $1/7$ 倍に濃縮した。

[0172] 次に、調製したサンプルを、精製したBTGを用いてウサギで作製した抗BTG抗体によるEIA法により定量した。その結果約 $0.1\text{mg}/\text{l}$ のBTGを検出できた。

[0173] なお、EIAは以下の様に行なった。

[0174] 1. サンプル $50\mu\text{l}$ に緩衝液A $500\mu\text{l}$ を加え混合し、そこに抗体結合ビーズ (ビーズはセキシイのポリスチレン製 #80を使用した。) を1個加え、 37°C , 30分間インキュベートした。

[0175] 2. 反応液を除き、ビーズを 10mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で2回洗浄した。

[0176] 3. 洗浄したビーズに β -ガラクトシダーゼ標識抗体 ($50\mu\text{g}/500\mu\text{l}$ 緩衝液A) $500\mu\text{l}$ を加え、 37°C で30分間インキュベートした。

[0177] 4. 反応液を除き、ビーズを 10mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で2回洗浄した。

50 [0178] 5. 洗浄したビーズを CPRG 溶液 $500\mu\text{l}$

μ lに加え、37°Cで30分間インキュベートした。*の吸光度を測定した。

[0179] 8. 反応停止液2mlを加えた後、575nm* [0180]

[緩衝液A]

0. 1M 塩化ナトリウム
0. 1% BSA
1 mM 塩化マグネシウム
0. 1% アジ化ナトリウム
10 mM リン酸緩衝液(pH 7.0)

[CPRG溶液]

CPRG(クロロフェノールレッド β -D-
ガラクトビラノシド、ベーリンガー) 1g
BSA 333.2 mg
リン酸一カリウム 833.2 mg
亜硫酸ナトリウム 166.8 mg
GH 333.2 ml /l(pH 5.0)

[GH]

5% 加水分解ゼラチン
0. 3M 塩化ナトリウム
1 mM 塩化マグネシウム
0. 1% アジ化ナトリウム
0. 1% BSA
50 mM リン酸緩衝液(pH 7.0)

[反応停止液]

10 mM エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム
1% ガラクトース
0. 1% アジ化ナトリウム
50 mM リン酸緩衝液(pH 7.0)

さらにこの組み換えBTGをウエスタンプロットにより解析した。まず、サンプルを既往の方法により処理し、SDS-PAGE電気泳動を行なった。SDS-PAGE電気泳動後、ゲル上のタンパク質をElectrophoretic Transfer Kit(LKB)を用いてメンブレン(Immobilon™(ミリポア))にトランスファーした。トランスファーの条件は、Electrophoretic Transfer Kitに添付されている説明書に従った。トランスファー後、メンブレンをBlocking Buffer(20mM Tris-HCl(pH 7.9), 5%スキムミルク) 10ml中にて1時間インキュベートした。その後、メンブレンを、BTG抗血清を200倍にRinse Buffer(10mM Tris-HCl(pH 7.9), 0.15M NaCl, 0.1mM EDTA(3Na), 0.25%スキムミルク, 0.01%NaN₃)で希釈した溶液10ml中にて1晩、4°Cでインキュベートした。インキュベート後、溶液を捨て、メンブレンを20mlのRinse Bufferで2度洗浄した後、次にメンブレンをAnti rabbit ¹²⁵Iラベルwhole antibody(アマシャム) 1 μ Ciを含むRinse Buffer 10ml中に移し4°Cで4時間インキュベートした。インキュベート後、メンブレンを20mlのRinse Bufferで2回洗浄し、その後メンブレンを取り出し、風乾した。風乾後、メンブレンをオートラジオグラフィーにかけ、シグナルを検出した。

[0181] 結果は、精製BTGと同一分子量である約50

37 kDaの位置に成熟体タンパク質としてのBTGが認められた(第2図参照)。この事は、*Streptomyces lividans* AKW-1によるBTG遺伝子発現において、前駆体遺伝子を導入したにもかかわらず成熟体タンパク質を分泌したことと示し、正しくプロセッシングがなされたことを示唆する。

[0182] 実施例5: BTG遺伝子(合成型)の酵母での発現

酵母におけるBTGの発現には、シグナル配列遺伝子の下流にBTG成熟体遺伝子或いはBTGプロ配列遺伝子とBTG成熟体遺伝子を組み込んだ発現ベクターを用いるという二つの方法をとった。

[0183] 発現ベクターとしては、酵母において強力なプロモーター活性を有すとして知られている解糖系のエノラーゼ遺伝子(E NO 1)のプロモーター配列を含む大腸菌・酵母シャトルベクターpNJ 1053を用いた。E NO 1のプロモーターを利用した酵母での発現は、ヒトリゾチーム(Ichikawa, K.等、Agric. Biol. Chem., 53, 2687(1989)など)が知られているが本ベクターはpBR322由来の大腸菌における複製オリジン、アンピシリン耐性遺伝子及び酵母の2 μ m複製オリジン、選択マーカーとしてはLEU2遺伝子とを併せ持つ高コピー型(YEP)ベクターである。

【0184】ここで、シグナル配列としてはヒトガストリンシグナル配列 (Kato, K. 等, Gene, 26, 53-57 (1983)) を用いた。21アミノ酸残基よりなるこのシグナル配列は、シグナルペプチダーゼにより21位のアラニンのカルボキシル末端側が切断されるものであり、ヒト- α アミラーゼをはじめ酵母での異種タンパク質発現分泌に利用されている (Sato, T. 等, Gene, 83, 355-365 (1989))。

【0185】また、シグナル配列と成熟体遺伝子配列の間に介在するプロ配列は、枯草菌でも知られているように翻訳されたタンパク質の活性発現において重要な役割を果すと考えられている (Ikemura, H. 等, J. Biol. Chem., 262, 7859-7864 (1987) など)。なお、この実施例で用いたBTGプロ配列とは、実施例1で明らかになったBTGシグナル様配列の下流に存在する-3'9位リジンから-1位プロリンまでの39アミノ酸残基を示す。

5' - AGCTTGGAT TCTGATGACA GAGTCCTCC ACCAG - 3'
3' - ACCTTA AGACTACTGT CTCAGTGAGG TGTTC - 5'

HindIII

さらにこれをXhoI認識部位上流に存在するSalIとHindIIIで切断し、約1.1kbpの断片を得、酵母発現ベクターpNJ1053のENO1プロモーターの下流に存在するSalI, HindIII間に挿入した。これを大腸菌JM109株に導入し、発現分泌ベクターpNJ1053-BTGを得た。

【0188】(2) BTGプロ配列-成熟体発現分泌ベクター pNJ1053-proBTG の構築

まず、BTGプロ配列部分をコードする遺伝子を合成した。その際、大腸菌や酵母のコドン使用頻度を考慮し、※

K R R S P T P K P T A S R R M T S R H Q
5' - AGCTTGGAAAGAAGAT CTCCA ACTCCAAAGCCAACTGCTTCTAGAAGAATGACTTCTAGACACCAA
3' ACCTTCTCTCTAGACGGTTGAGGTTTCCGTTGACGAAGAT CTTACTGAAAGATCTGTGGTT
10 20 30 40 50 60

HindIII

R A Q R S A P A A S S A G P S F R A P D
ACAGCTAAAGATCTGCTCCAGCTGCTTCTCTGCTGGTCCATCTTCAGAGCTCCAGAT
TCTCGAGTTCTAGACGAGGTCGACGAAGAAGACGACCAAGTAGAAAGTCTCGAGGTCTA
70 80 90 100 110 120

S D D R V T P P
TCTGATGACAGAGTCACTCCACCAAG-3'
AGACTACTGTCTCAGTGAGGTGGTC-5'
130 140

PvuII

【0190】本配列の合成には、1本あたり約50塩基のDNA鎖を3本表裏で合計6本化学合成した。(DNA合成は、アプライドバイオシステムズ社のDNA合成機380Aを使用した。) 化学合成したオリゴヌクレオ

*す。

【0186】(1) BTG成熟体発現分泌ベクター pNJ1053-BTG の構築

まず、ガストリンシグナル配列を有するベクター (Sato, T. 等, Gene, 83, 355-365 (1989)) よりシグナル配列をコードする遺伝子を含む約90bpのXhoI・HindIII断片を切り出し、あらかじめXhoIとHindIIIで切断処理したベクター pHSG396 (宝酒造, Takeshita, S. 等, Gene, 61, 63-74 (1987)) に挿入し、pHSG396-CSを得た。このHindIII消化物と、下記に示す約30bpの合成オリゴヌクレオチド及び実施例2で化学合成されたBTG遺伝子のPvuII-HindIII断片 (約1kb) とを連結し、BTG成熟体遺伝子がシグナル配列遺伝子の下流に正しく挿入されたものを選択した。

【0187】

【表20】

PvuII

20※ またシグナル配列遺伝子や成熟体遺伝子との連結のための制限酵素認識部位を配置した。即ち、プロ配列遺伝子の5'末端にはシグナル配列遺伝子との連結のためのHindIII粘着末端配列を、3'末端には実施例2で化学合成されたBTG遺伝子のPvuII認識部位に連結するための配列を配置した。

【0189】

【表21】

チドは、実施例2で化学合成されたBTG遺伝子の合成の時と同様の手順によりリン酸化、アニーリング、ライゲーションという反応を行なった。反応後、10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行ない、約150bpのD

NA断片をゲルから回収した。次に、(1)と同様にpHSG396-GSのHindIII消化物と、回収した約150bpの合成オリゴヌクレオチド及び実施例2で化学合成されたBTG遺伝子のPvuII・HindIII断片(約1kb)とを連結し、BTGプロ配列遺伝子がシグナル配列とBTG成熟体遺伝子の間に正しく挿入されたものを選択した。さらにこれをXbaI認識部位上流に存在するSalIとHindIIIで切断し、約1.2kbの断片を得、酵母発現ベクターpNJ1053のE NO 1プロモーターの下流に存在するSalI、HindIII間に挿入した。これを大腸菌JM109株に導入し、発現分泌ベクターpNJ1053-proBTGを得た。

【0191】(3)酵母におけるBTG遺伝子の発現
(1)、(2)で各々得られた発現分泌ベクターpNJ1053-BTGとpNJ1053-proBTGの宿主酵母Saccharomyces cerevisiae KSC22-1C (MAT_a, ss11, leu2, his⁻, ur⁻, a3)への導入は、アルカリ金属処理法 (Ito, H. 等, J. Bacteriol., 153, 163-168 (1983)) を用いた。その*

合成培地	0. 67%	YNB
	8%	グルコース
	2.0 mg/1	L-ヒスチジン塩酸塩
	2.0 mg/1	ウラシル
	0. 5%	Casamino acid (Difco 社)

次いでガラスピース法 (Hitzeman, R.A.等 Science, 219, 620-625 (1983)) により菌体抽出液を調製した。すなわち培養液10mlから遠心分離により集菌し、滅菌水で1回洗浄後、1mlのTris-HCl (pH 6.0) に懸濁する。これに1mlのガラスピース (ピーブラウン社、径0.45-0.5mm) を加え、Vortexミキサーを用い0~4°Cで1分間激しく攪拌を3回行う。低速遠心でガラスピースを分離後、上清をエッペンドルフチューブに移し、さらには12,000 rpmで5分間遠心し、その上清を取り抽出液とした。

【0194】そこで、BTG遺伝子産物が生成していることを確認するため、精製BTGを用いてウサギで作製した抗BTG抗体によるウェスタン・ブロッティングを、ベクター社のVectastain ABC kitを用いて行なった。発現分泌ベクターpNJ1053-BTGあるいはpNJ1053-proBTGを保持する各々の酵母の菌体抽出液の総タンパク量にして約1μgになる量をSDS-ボリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、泳動後のゲルをメンブレン (Immobilon, ミリポア社) にトランスファーして抗原となるタンパク質をメンブレンに結合させた。その後、ウサギ抗BTG抗体 (抗体価64倍のものを1000倍希釈した) によるウェスタン・ブロッティングを行ない、遺伝子

配列

GATTCTGATC ACAGAGTCAC TCCACCACTT GAAACATTGG ATAGAATGCC AGATCCATAC	60
AGACCATCTT ACCGCTAGACC TGAACACTGTT GTCAACAACT ACATTAGAAA GTGGCAACAA	120
GTCTACTCTC ACACAGATCG TAGAAAGCAA CAAATGACTG AAGAACAAAG AGAATGGTTG	180
TCTTACCGTT GTGTTGGTGT TACTTGGTTT AACTCTGGTC AATACCCAAC TAACAGATTG	240
CTTTTCGCTT CTTTCGATGA AGATAGATTG AAGAACGAAT TGAAGAACCG TAGACCAAGA	300

*際、栄養要求性変異を相補する遺伝子を組み込んだプラスミドで形質転換されたクローンの選択、培養には最少培地が必要であるが、形質転換体の選択に用いた最少培地は、Difco社より市販されているbacto yeast nitrogen base (YNB) の0.67%溶液に2%グルコース、そして宿主酵母の栄養要求性に応じて20mg/1L-ヒスチジン塩酸塩、20mg/1ウラシルを添加したものである (プレートの場合はさらに2%アガーレを加える)。Leu⁺となった形質転換体は、30°Cで培養すると2~4日でコロニーを形成した。

【0192】これら分泌発現ベクターpNJ1053-BTGあるいはpNJ1053-proBTGを保持する形質転換体をそれぞれ、プラスミドの脱落を防ぐため最少培地で30°C、一晩前培養した後、下に示す組成の合成培地10mlに植えつけ (5%) 30°C、2日間振盪培養した。

【0193】

※子産物をタンパクレベルで確認した。

【0195】その結果、以下の1, 3, 4のレーンにおいて同一の位置に発色したバンドが現われ、抗BTG抗体との反応を示すタンパク質が精製BTGと同一分子量の位置に検出できた。

【0196】1. : 精製BTG (コントロール)
2. : pNJ1053を保持する酵母の菌体抽出液
3. : pNJ1053-BTG (BTG成熟体遺伝子)を保持する酵母の菌体抽出液
4. : pNJ1053-proBTG (BTGプロ配列-成熟体遺伝子)を保持する酵母の菌体抽出液
なお、各々について培養上清もウェスタン・ブロッティングを行なったが、培養上清にはバンドが検出されなかった。また、レーン4のBTGプロ配列-成熟体遺伝子を組み込んだ分泌発現ベクターpNJ1053-proBTGを保持する酵母では、酵母内で合成したプロ配列のプロセシングが、正しく行われたため、精製BTGと同一分子量の位置にバンドが現われたものと考えられる。

【0197】

【配列表】配列番号: 1

配列の長さ: 993

配列の型: 核酸

37

38

TCGGTGAAGA CTAGAGCTGA ATTGGAAAGGT AGAGTTCTA AGAATCTT CGATGAAGAA	360
AAGGTTCC AAAGAGCTAG AGAAGTTCT TCTGTTATGA ACAGACCTCT AGAAAACCT	420
CACGATGAAT CTGCTTACTT CGATAACTTG AAGAAGGAAT TGGCAACCG TAACGATGCT	480
TTGAGAAACG AACATCTAG ATCCCCATTC TACTCTCTT TGGAGAACAC TCCATCTTTC	540
AAGGAAAGAA ACCGTCGAA CCACGATCCA TCCAGAAATGA AGGCTGTTAT TTACTCTAAG	600
CACTCTGT CTGCTCAAGA TAGATCTTCT TCTGCTGATA AGAGAAAGTA CGGTGATCCA	660
CATGCTTCA GACCAGCTCC AGGTACCGT TGGTGGACA TGTCCAGACA TAGAAACATT	720
CCAAGATCCC CAACCTCTCC AGGTGAAGGT TGGTCAACT TGGATTACCG TGGTTGCGT	780
CTCTAAACTG AACGTCGATCC TGATAAGACT GTTGGACCC ATGGTAACCA CTACCAACCT	840
CCAAACGGTT CTTCGGTCC TATCAGCTC TACCAATCTA AGTTAGAAA CTGGTCTGAA	900
GTTACTCTG ATTCGATAG AGGTGGTACG GTTATTACTT TCAATTCCAA GTCTTGGAAC	960
ACTGCTCCAG ACAAGGTCAA CCAAGGTGG CCA	9

9 3

配列番号：2

配列の長さ：117

* 配列の型：核酸

*

配列

AAGGAAAGAT CTCCAACCTCC AAAGCCAACT GCTTCTAGAA GAATGACTTC TAGACACCAA	60
AGAGCTCAA GATCTGCTCC AGCTGCTCT TCTGCTGTC CATCTTTCAG AGCTCCA	117

配列番号：3

配列の長さ：1322

* 配列の型：核酸

※20

配列

TGGGGGGAGG CGTAAGGAAT CGGGGTTCAT CGGGACGGTGC TTGGGACACGG CGGGGTTCAA	60
CGATGTTCCA CCACAAAGGA GTTCCAGGTT TCCATGGCT ATACGGGGGA CGCTCTGTC	120
TTCCGCACTA TGAGTGGGT TTATGACCG CGCGATTCA CGCGTCCGGG CGGGAGGGCG	180
CGCCCGACAA TGGGGGGGGG GAAGAGACCA AGTCTACGC CGAACCTAC CGGCTCACCG	240
CGGATGACGT CGGACATCA AGGGGCTCAA CGAACCGCTC CGGGGCTTC GAGGGGGGG	300
CGCTGTTCC GGGGGGGGA CTGGGACGAC AGGTCAACCC CTCCCCGGG CGCGCTCGAC	360
AGGATCCCCG ACCCGTACCG TCCCTCGTAC CGCACGGGGG AGACGGTGTG CAACAACTAC	420
ATACCAAGT CGCACCGAGT CTACACCCAC CGGACCGCA CGAACCGAGA GATGACCGAG	480
GACCAACGGG AGTGGCTGTC CTACGGCTOC GTGGGTGTC CCTGGGTCAA TTGGGTGAG	540
TACCCACGA ACAGACTGOC TTGGGTGTC TTGGACGGAG AGAAGTCAA GAACGAGCTG	600
AAGAACCGCA CGCCCGGGTC CGGGAGACG CGGGCGAGT TGGAGGGGG CGTGGCGAAG	660
GAGACCTTG ATGAAGAGAA CGGGTGGAG CGGGGGGTG AGTGGGGTC CGTGATGAAC	720
AGGGCCCTGG AGAACCCCA CGAACGAGAAC CGTACCTCG AGAACCTCAA GAACGAGCTG	780
CGGAACCGCA CGAACCGCT CGAACACCGAG GAGGGGGTT CGGGTTCTA CTGGGGCTG	840
CGGAACACCG CGTCTTTAA CGAACCGGAAC CGAACCAATC AGAACCGGTC CGGGATGAAG	900
CGCGTCATCT ACTCGAACCA CTTCGGGAC CGAACGGACC CGTGGAGTTC CGGGACAAAG	960
AGGAAGTACG CGAACCCCGA CGCTTCCCG CGGGGGGG CGAACCGGCGT CGTGACATG	1020
TCGACGGACA CGAACATTC CGAACGGGG ACCAGGGCGG GTGAGGGATT CGTCAATTTC	1080
GACTACGGCT GTTGGGGCC CGAACGGAA CGAACGGCG AGAACACCGT CGAACCCAC	1140

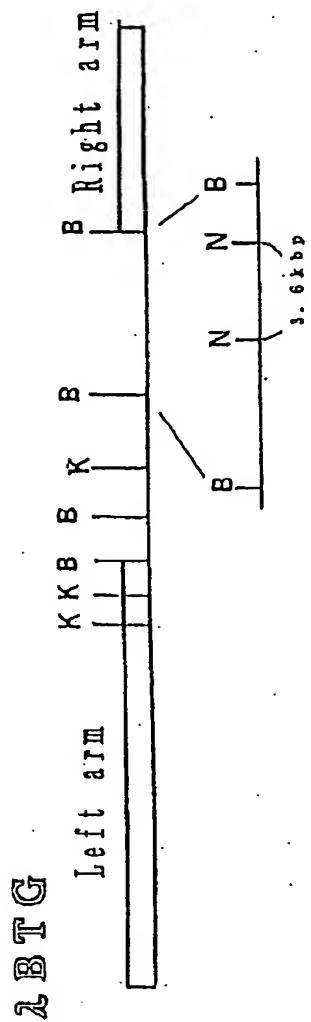
CGAACATCACT ATCACGGCCC CAATGGCAGC CTTGGTCCA TGGATGATA CGAGACCAAG	1200
TTGGGCAACT GGTGGAGG TTACTCCGAC TTGGACCGCG CGGGCTATGT CATCACCTTC	1260
ATCCCGAAGA GCTGGAAACAC CGCCCCCGAC AACGAAAGCC AGGCTGGCC GTGATGTGAG	1320
CG	1322

【図面の簡単な説明】

【図1】第1図。Streptoverticillium sp. 由来のクローンDNAの制限地図。

【図2】第2図。Streptomyces lividans で発現したB-TGのウェスタンプロット解析結果。

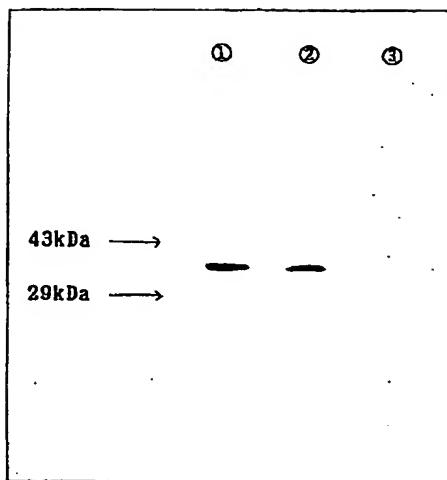
[図1]



K: KpnI, B: BamHI, N: NcoI

第1回

【図2】



- ① 精製BTG
- ② pIJ702-BTG
- ③ pIJ702

第 2 図

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 12 N 15/70				
// C 07 K 13/00		8619-4H		
(C 12 N 15/54				
C 12 R 1:625)				
(C 12 N 1/19				
C 12 R 1:865)				
(C 12 N 1/21				
C 12 R 1:19)				
(C 12 N 1/21				
C 12 R 1:465)				
(C 12 N 9/10				
C 12 R 1:19)				
(C 12 N 15/70				
C 12 R 1:19)				

(72)発明者 松井 裕
神奈川県川崎市川崎区鈴木町1番1号 味
の素株式会社中央研究所内
(72)発明者 鶴津 欣也
茨城県つくば市御幸が丘22番 天野製薬株
式会社筑波研究所内

(72)発明者 安藤 啓一
茨城県つくば市御幸が丘22番 天野製薬株
式会社筑波研究所内
(72)発明者 小池田 聰
茨城県つくば市御幸が丘22番 天野製薬株
式会社筑波研究所内